배양된 사람 정상 코점막 상피세포에서 Interleukin-13이 MUC5AC 유전자 발현 및 점액분비에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국 21 의과학사업단[2]
이정권[1] · 김창훈[1] · 김현웅[1] · 최재영[1] · 배정호[1] · 윤주헌[1,2]

Interleukin-13 Suppresses MUC5AC Gene Expression and Mucin Secretion in Cultured Normal Human Nasal Epithelial Cells

Jeung-Gweon Lee, MD[1], Chang-Hoon Kim, MD[1], Hyun-Ung Kim, MD[1], Jae Young Choi, MD[1], Jungho Bae[1] and Joo-Heon Yoon, MD[1,2]

[1]Department of Otorhinolaryngology and [2]BK21 Project for Medical Sciences, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives：It is not clear which mucins are responsible for the mucus hypersecretion in allergic rhinitis and allergic asthma. Recently, it was found that IL-13 is closely related to allergic inflammation and mucus hypersecretion in in vivo animal models. However, the role of IL-13 in in vitro cellular models has yet to be determined. This study aimed to investigate the direct effect of IL-13 on mucin gene expression and mucin secretion in cultured normal human nasal epithelial cells. **Materials and Method**：Cells were cultured with passage-2 normal human nasal epithelial cells using the air-liquid interface culture method. After treatment with IL-13, the total mucin and MUC5AC mucin levels were measured using the immuno-blotting assay. The MUC2, MUC5AC, and MUC8 mRNA expressions were measured using RT-PCR. Immunostaining was also performed using a MUC5AC antibody on histologic and cytospin slides. **Results**：After treatment with 5 ng/ml or more of IL-13, the level of total mucin and MUC5AC mucin secretion decreased substantially. The expression of MUC2 and MUC8 mRNA increased with higher concentrations of IL-13, but the expression of MUC5AC mRNA decreased. On the 7 th day after IL-13 treatment, a significant decrease in the number of MUC5AC-positive cells was confirmed with immunostaining. **Conclusion**：These findings indicate that IL-13 suppresses MUC5AC mucin gene expression and mucin secretion in cultured normal human nasal epithelial cells in vitro. **(Korean J Otolaryngol 2001;44:1150-6)**

KEY WORDS：Interleukin-13 · Mucins · MUC5AC.

서 론

점액(mucus)은 상기도와 하기도의 숙주방어(host defense)에 중요한 역할을 한다. 하지만 과생성된 점액은 천식이나 알레르기성 비염과 같은 기도의 염증성 질환에서 증상의 심화와 합병증을 야기할 수 있다. 점액 당단백질(mucus glycoproteins) 즉, 점액소(mucin)는 기도 점액의 주요 조성물이다. 지금까지 13개의 인체 점액유전자(MUC1-4, MUC5AC, MUC5B, MUC6-9, MUC11-13)가 밝혀졌다.[1-5] 그중 MUC2와 MUC5AC는 기도점막의 배세포에서 발현되는 점액유전자로 알려져 있다.[1)6)7)] 하지만 정상 또는 병적인 기도, 특히 알레르기 염증성 점막에서 점액유전자와 점액과분비를 조절하는 기전에 대해 알려진 바는 적다.

CD4+ T세포는 두개의 helper T세포군, 즉 Th1세포와 Th2세포로 나누어진다. Th1세포는 IL(interleukin)-2, INF(interferon)-γ, TNF(tumor necrosis factor)-β를 분비하고 세포경유 면역반응(cell-mediated immune response)에 관여하며, Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 분비하고 알레르기성 염증반응에서 항체경유 염증반응(IgE-mediated inflammation)에 관여한다.[8)] 이중 Th2세포에서 분비되는 IL-4와 IL-13에 대하여 많은 연구가 있었

논문접수일 : 2001년 9월 12일 / 심사완료일 : 2001년 9월 24일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361-8484 · 전송 : (02) 393-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

고 이들이 Th2세포에 의한 염증반응에 관여한다는 보고들이 있다.[8)9)] 이 두 사이토카인은 모두 인체 B세포에서 IgE를 생성하게 유도하며[10)] 단핵구(monocyte)와 거식세포(macrophage)에서 TNF-α와 IL-1의 발현을 감소시킴으로써 염증반응을 조절하고[10)11)] 점액과분비로 특징 지워지는 천식과 알레르기성 비염에서 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다.[8)12-15)]

IL-13은 pleotropic 12-kDa 단백질로 다섯번째 염색체의 q31 부위에 유전자가 존재하며 적당히 자극된 CD4+ Th2세포에 의해 생성된다.[9)] IL-13과 IL-4는 공통적인 수용체, 즉, IL-4-receptor -chain을 가지고 있고, STAT (signal transducer and activator of transcription)-6라는 공통된 신호전달기전(signal transduction mechanism)을 가져 많은 공통된 생물학적 작용(overlapping effecter function)을 보인다.[16)] IL-13은 IgE의 생성에 중요한 역할을 하며, in vitro에서 염증을 유도하는 사이토카인(proinflammatory cytokine)이나 케모카인(chemokine)을 억제하고, in vivo에서는 강력한 항염작용을 갖는다.[9)] 특히 요사이 IL-13은 in vivo 동물모델에서 알레르기성 염증과 점액과분비에 밀접하게 관계한다고 알려져 있다.[12)13)] 하지만 저자들의 IL-4에 대한 이전의 연구와 다른 보고자에 따르면,[17)18)] IL-4가 in vitro 세포배양모델에서 MUC5AC 유전자 발현과 점액분비를 감소시킴을 관찰할 수 있었고, IL-4와 같은 세포에서 분비되고 같은 신호전달체계를 가지고 있는 IL-13도 점액분비에 같은 역할을 한다고 가정할 수 있다. 이에 저자들은 배양된 기도상피세포에서 IL-13이 점액분비 및 점액유전자 발현에 미치는 직접적인 영향에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Air-liquid interface(ALI) 배양 및 IL-13 처치

10^5개의 정상 코점막 상피세포(passage-2)를 basal epithelial growth medium(BEGM)과 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM)을 1 : 1로 혼합한 용액에 호르몬과 각종 성장인자가 첨가된 무혈장 배양액에 부유하여 평판하였다.[19)] 배양용기는 반투과성막(24.5 mm, 0.45 m pore size ; Transwell-clear, Costar Corp., Cambridge, MA)이 있는 것을 사용하였다. 세포들은 첫 9일간은 배양액에 잠긴 상태로 두었고 ALI를 만드는 9일까지는 격일로 배양액을 갈아주었으며 그 후 배양액은 배양용기의 아래쪽 부분만 매일 갈아주었으며 위쪽은 배양액을 제거하여 공기에 노출시켰다.

IL-13 처치 용량에 의한 점액분비와 점액유전자 발현의 변화를 보기 위해, 배양된 상피세포는 배양 16일째 0.2, 1, 5, 25 ng/ml의 IL-13으로 처치하였다. 처치 4일째 세포상층에서 부유액을 채취하였다. IL-13 처치 시간에 따른 점액분비와 점액유전자 발현의 변화를 보기위해 IL-13 5 ng/ml을 1, 2, 4, 7일 동안 첨가 배양하였다. 위상차 현미경 (phase contrast microscopy)을 통해, IL-13을 7일 동안 처치하더라도 세포독성에 의한 세포의 변성을 발견할 수는 없었다. 세포상층 부유액은 1.5 ml의 PBS(phosphate buffered saline)에 채취하였으며 같은 실험을 3회 반복하여 시료간의 편차를 결정하였다. 총 RNA는 정상 인체 코점막 상피세포에서 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH)를 이용하여 분리하였다. MUC5AC 양성세포를 검출하기 위해 각 시간대에 조직 및 cytospin 슬라이드를 제작하였다.

분비물의 면역적 검출 및 정량

배양된 정상 사람 코점막 상피세포에서 분비물 측정을 위한 방법은 immunoblot을 이용하며, 이전에 자세히 기술한 바 있다.[19)] 이번 실험에서는 총 점액과 MUC5AC 점액을 측정하였다. 순수 인체점액(generous gift from Dr. CW Davis, University of North Carolina, Chapel Hill, NC)을 표준으로 사용하였다. 총 점액에 대한 일차항체로는 단클론항체인 H6C5(1 : 1000, generous gift from Dr. CW Davis, University of North Carolina, Chapel Hill, NC)를 사용하였고, MUC5AC에 대한 일차항체는 단클론 항MUC5AC 항체(NeoMarkers Inc., Union City, CA)를 사용하였다. 배양된 세포에서 채취된 분비물과 표준들은 일정한 비율로 희석하여 나이트로셀룰로즈막에 적용하여 일차항체와 반응시킨 후 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG에 반응시켰으며 chemiluminescence (ECL kit, Amersham, Buckinghamshire, UK)로 발광시켰다. 이후 표준곡선을 직선회귀분석을 이용하여 그린 후, 각 검사물의 발광정도와 비교하여 정량하였다. 각 실험 결과는 같은 실험을 3회 이상 시행하여 평균표준편차로서 나타냈으며 통계학적 처리는 Student's *t*-test로 하였다.

MUC2, MUC5AC, MUC8 mRNA 검출을 위한 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

점액유전자의 발현이 Northern blot에 의해 신뢰성 있는 결과가 나오지 않아 저자들은 점액유전자의 검출을 위해 RT-PCR을 이용하였다.[19)] Oligonucleotide primer는 밝혀진 염기서열에 의해(human MUC2 ; Genbank accession #L21998, human MUC5AC ; Genbank accession #U06711,

human MUC8 ; Genbank accession #U14383) 제작하였다. RT-PCR은 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler를 이용하여 시행하였다. 기술한 각 유전자의 mRNA를 비교하기 위해 비교역학분석(comparative kinetic analysis)을 시행하였다.[19]

MUC5AC 점액의 면역조직화학 염색

각 배양세포는 4% paraformaldehyde에 24시간동안 고정하였고, 12%와 18% sucrose로 동결보존(cryoprotection)한 후, 사용하기 전에는 deep freezer에 보관하였다. 이들은 10 m 두께의 동결절편으로 만들어진 후 항MUC5AC 항체(1 : 100)와 반응시켰다. 이차항체는 peroxidase와 결합된 anti-mouse 이차항체를 이용하였다. 음성대조군은 일차항체를 사용하지 않고 이차항체로 순수 mouse IgG를 이용하였다.

MUC5AC 점액의 면역세포화학 염색 및 MUC5AC 양성 세포의 정량

배양세포를 효소로 분리시킨 후, cytospin 슬라이드를 한 슬라이드 당 5×10^5 세포의 밀도로 제작하였다. 세포들은 cold acetone과 methanol의 1 : 1 용액으로 고정하고, 항MUC5AC 항체(1 : 100)를 이용하여 면역염색을 시행하였다. 항원-항체반응은 peroxidase와 결합된 항mouse 이차항체를 이용하여 검출하였다. 음성대조군은 일차항체를 사용하지 않고 이차항체로 순수 mouse IgG를 이용하였다. MUC5AC 양성세포의 수는 각 슬라이드에서 1000개의 세포중에서 MUC5AC 항체에 염색된 세포수로 결정하였다.

통계학적 분석

모든 결과는 평균표준편차로 표현하였다. 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하였고, $p<0.05$를 통계학적으로 유의한 것으로 보았다.

결 과

IL-13 처치 용량에 따른 총 점액과 MUC5AC 점액의 분비량 변화

IL-13의 4가지 농도(0.2, 1, 5, 25 ng/ml)에 의한 세포상층 분비액은 처치 4일 후 채취하였다. 예비실험에서 IL-13에 의해 점액분비가 처치 4일째 현저하게 감소하였기 때문에 채취시기를 처지 4일째로 정했다. 총 점액량은 대조군에서 213.8±29.7 g/10^6 cells, 0.2 ng/ml의 IL-13을 처치한 군에서 257.0±41.7 μg/10^6 cells, 1.0 ng/ml의 IL-13을 처치한 군에서 219.7±32.2 μg/10^6 cells, 5 ng/ml의 IL-13을 처치한 군에서 147.5±21.6 μg/10^6 cells, 그리고 25 ng/ml의 IL-13을 처치한 군에서 76.3±21.1 μg/10^6 cells을 보였다(Fig. 1A). MUC5AC 점액량은 대조군에서 38.7±4.6 μg/10^6 cells, 0.2 ng/ml의 IL-13을 처치한 군에서 43.8±4.1 μg/10^6 cells, 1.0 ng/ml의 IL-13을 처치한 군에서 23.7±3.1 μg/10^6 cells, 5 ng/ml의 IL-13을 처치한

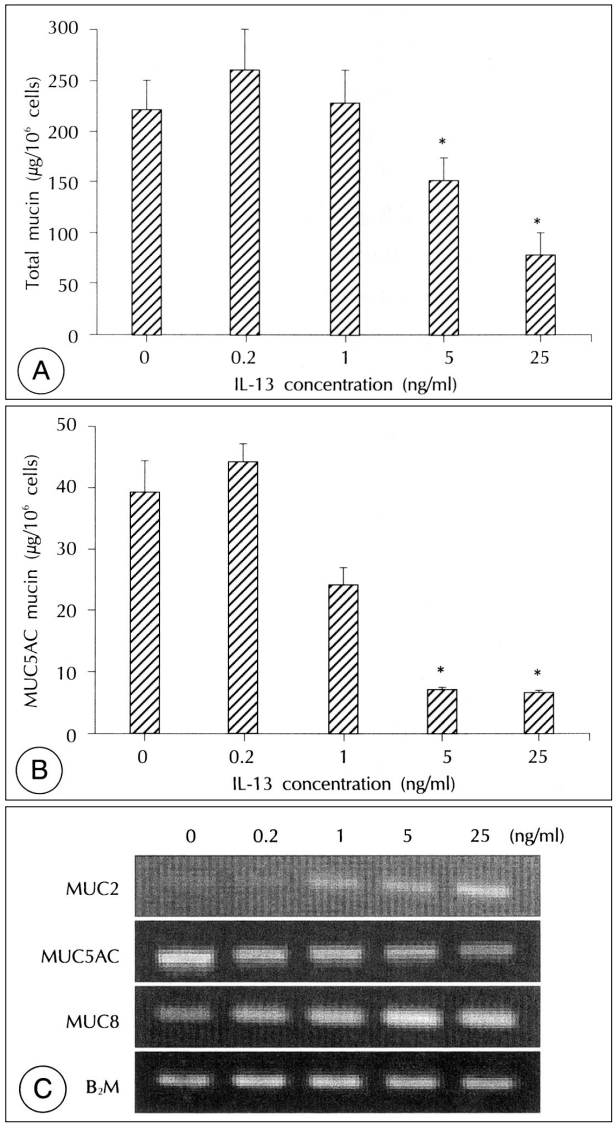

Fig 1. Dose effects of IL-13 on mucin gene expression and mucin secretion. A : The levels of total mucin secretion decreased in a dose-dependent manner with IL-13 treatment. B : The levels of MUC5AC secretion also decreased in a dose-dependent manner with IL-13 treatment. Significant differences compared to the control in the decrease of total mucin secretion and MUC5AC mucin secretion were noted in the groups treated with 5 ng/ml or more of IL-13 (* : $p<0.05$). C : Mucin gene expression by RT-PCR. MUC2 and MUC8 mRNA expression increased with increasing doses of IL-13. On the contrary, MUC5AC mRNA expression decreased in a dose-dependent manner (2 microglobulin as control).

군에서 7.2±0.6 μg/10^6 cells, 그리고 25 ng/ml의 IL - 13을 처치한 군에서 5.9±1.1 μg/10^6 cells을 보였다(Fig. 1B). 총 점액과 MUC5AC 점액의 분비는 5 ng/ml 이상의 IL - 13을 처치한 군에서 대조군보다 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 그래서 이후의 실험에서 5 ng/ml의 IL - 13을 이용하였다.

정성적인(qualitative) RT - PCR로 MUC5AC mRNA 발현의 감소를 측정하기가 다소 어려운 점은 있지만, 3회의 반복 실험에서 대조 유전자로 쓰인 2 βmicroglobulin(β2M)은 아무 변화를 보이지 않는 것에 비해 MUC5AC mRNA의 발현은 IL - 13의 처치용량이 증가함에 따라 지속적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 반면에 MUC2와 MUC8 mRNA의 발현은 IL - 13의 용량에 비례해 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C).

IL - 13 처치 시간에 따른 총 점액과 MUC5AC 점액의 분비량 변화

총 점액분비량을 처치 시간에 따라 분석한 결과에서, 1일 군에서 대조군의 총 점액분비량은205.9±11.7 μg/10^6 cells, 5 ng/ml의 IL - 13을 1일 동안 처치한 군에서의 총 점액분비량은 202.1±26.9 μg/10^6 cells, 2일군에서 대조군은 205.7±5.5 μg/10^6 cells, IL - 13 처치군은 126.6±5.9 μg/10^6, 4일군에서 대조군은 414.1±70.5 μg/10^6 cells, IL - 13 처치군은 250.4±17.6 μg/10^6 cells, 7일 군에서 대조군은 677.9±79.6 μg/10^6, IL - 13 처치군은 235.5±51.1 μg/10^6 cells이었다(Fig. 2A). MUC5AC 점액분비량을 처치 시간에 따라 분석한 결과는, 1일 군에서 대조군의 총 점액분비량은 121.7±29.4 μg/10^6 cells, 5 ng/ml의 IL - 13을 1일 동안 처치한 군에서의 MUC5AC 점액분비량은 105.9±23.1 μg/10^6 cells, 2일군에서 대조군은 133.1±15.4 μg/10^6 cells, IL - 13 처치군은 120.1±3.7 μg/10^6, 4일군에서 대조군은 262.6±25.8 μg/10^6 cells, IL - 13 처치군은 21.9±4.9 μg/10^6 cells, 7일 군에서 대조군은 376.9±57.9 μg/10^6, IL - 13 처치군은 25.5±9.9 μg/10^6 cells이었다(Fig. 2B).

결과적으로 총 점액분비량에서 IL - 13을 처치하지 않은 군에서는 시간이 지남에 따라 총 점액분비량이 증가하는 반면, IL - 13을 처치한 군에서는 증가하지 않음을 관찰할 수 있었고, 4일의 처치 이후에서 두 군의 차이가 통계학적으로 유의함을 보였다. MUC5AC 점액분비량도 대조군과 IL - 13 처치군에서 4일 이후에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다.

RT - PCR 분석에서도, β2M 유전자의 발현은 변하지 않는 반면에 MUC5AC mRNA 발현은 시간이 지남에 따라 지속적으로 감소하는 양상을 보였다. 반면에 MIUC2와 MUC8 mRNA의 발현은 시간에 지남에 따라 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C).

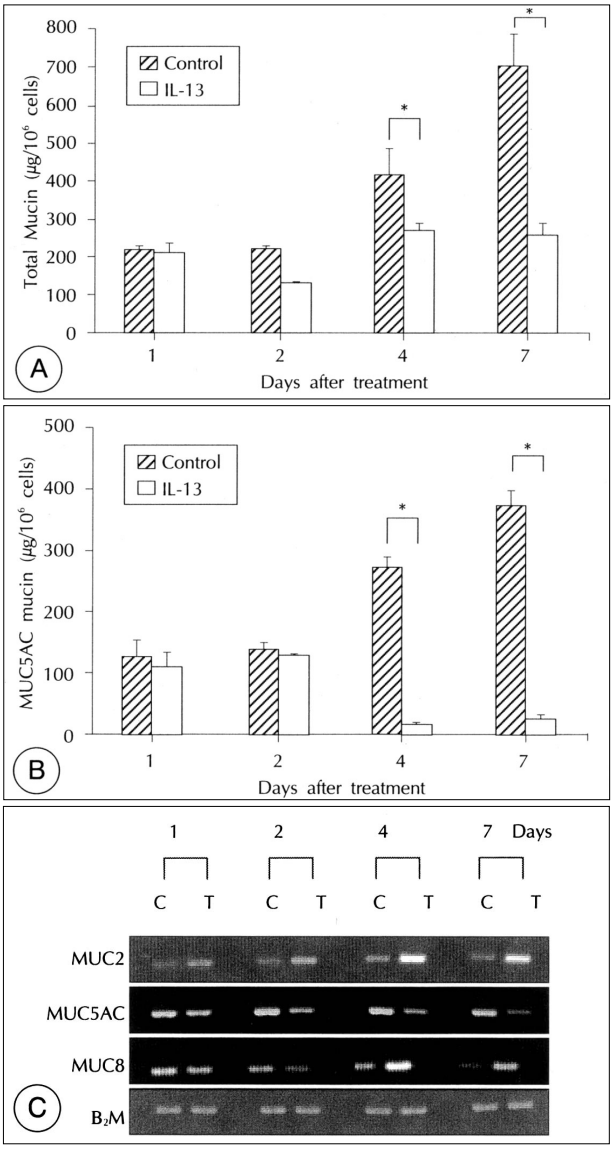

Fig 2. Time course effects of IL-13 on mucin gene expression and mucin secretion. A : The levels of total mucin secretion did not increase along the time course, as compared to the significant increase of total mucin level in the control group. B : The levels of MUC5AC secretion decreased in a time-dependent manner with IL-13 treatment. Significant differences between the control group and the IL-13 treated group were noted in terms of both total mucin secretion and MUC5AC mucin secretion at 4 or more days after treatment with IL-13 (* : $p<0.05$). C : Mucin gene expression by RT-PCR. MUC2 and MUC8 mRNA expression increased along the time-course of IL-13 treatment. On the contrary, MUC5AC mRNA expression decreased in a time-dependent manner.

MUC5AC 점액의 면역조직화학염색

MUC5AC 점액에 대한 면역염색에서, 대조군은 많은 MU -

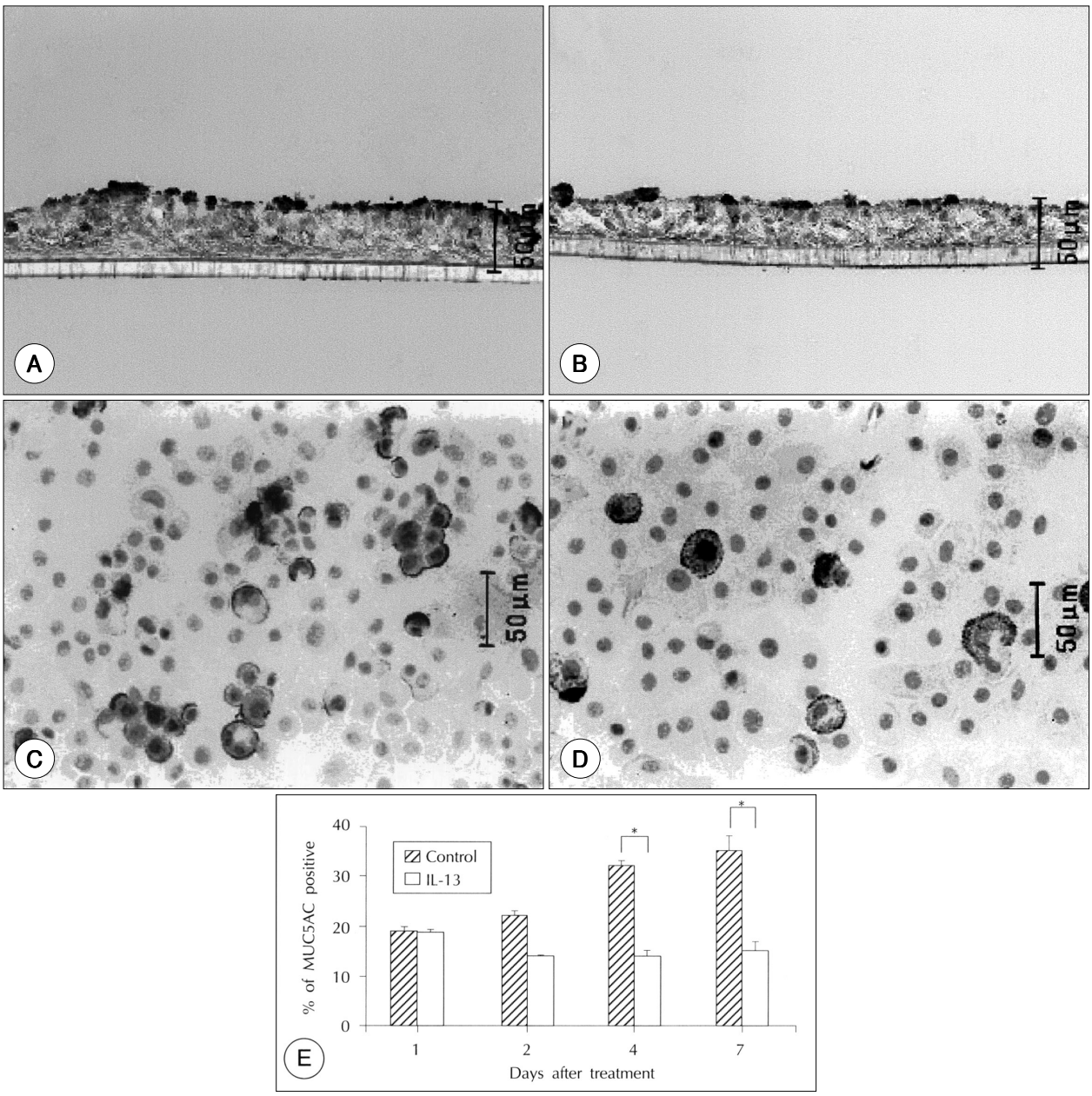

Fig. 3. Immunohistochemical and immunocytochemical analysis of MUC5AC expression after IL-13 treatment. A : MUC5AC immunohisto-chemical staining of control normal human nasal epithelial (NHNE) cells revealing abundant MUC5AC-positive cells in the surface epithelial layer. B : MUC5AC immunohistochemical staining of NHNE cells after 7 days of 5 ng/ml IL-13 treatment revealing decreased number of MUC5AC-positive cells. C : MUC5AC immunocytochemical staining of control NHNE cells in the cytospin slide revealing abundant MUC5AC-positive cells. D : MUC5AC immunocytochemical staining of NHNE cells after 7days of 5 ng/ml IL-13 treatment in the cytospin slide revealing decreased number of MUC5AC-positive cells. E : Quantitation of MUC5AC-positive cells in the control group and the group treated with 5 ng/ml of IL-13 for 7 days in the cytospin slides. The number of MUC5AC-positive cells increased along the time course in the control group, but decreased in the IL-13 treatment group, and the difference was statistically significant after 4 days of treatment (* : $p<0.05$).

C5AC 양성세포를, 특히 잘 분화된 배양 상피세포의 분비세포에서 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 하지만 IL-13 처치군에서는 MUC5AC 점액 양성세포의 수가 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B).

MUC5AC 점액의 면역세포화학염색 및 MUC5AC 양성세포의 정량

Cytospin 슬라이드에서 시행한 면역세포화학 염색에서, 대조군에서는 MUC5AC 양성세포가 풍부했던 반면(Fig. 3C),

IL-13 처치군에서는 상당히 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3D). 전체 세포수 중에서 차지하는 MUC5AC 양성세포의 백분율은 다음과 같다 : 1일군에서 대조군은 18.61.4%, IL-13 처치군은 18.31.1% ; 2일군에서 대조군은 21.61.1%, IL-13 처치군은 13.70.5% ; 4일군에서 대조군은 31.31.6%, IL-13 처치군은 13.61.4% ; 7일군에서 대조군은 34.62.6%, IL-13 처치군은 14.52.2%. 결과적으로 MUC5AC 양성세포는 4일 이상의 IL-13 처치군에서 대조군보다 통계학적으로 유의하게 적은 수를 보였다($p<0.05$)(Fig. 3E).

고 찰

점액과분비와 배세포과증식은 알레르기성 천식(allergic asthma)과 알레르기성 비염(allergic rhinitis)의 중요한 표현형(phenotype)이다. 많은 사이토카인과 케모카인이 알레르기질환의 병태생리와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있지만 점액과분비를 일으키는 정확한 기전에 대해서는 알려진 바가 적다. 알레르기성 염증반응은 Th1세포에서 분비되는 IFN-γ와 Th2세포에서 분비되는 IL-4의 균형에 의해 조절된다고 알려져 있다. 하지만 요사이는 Th2세포에서 분비되는 IL-13이 알레르기성 질환에서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. Wills-Karp 등과 Grnig 등은 IL-13 과분비 형질전환생쥐(IL-13 overexpressing transgenic mice)에서 IL-13이 기도 배세포의 점액과분비를 유도하는 중요 매개체(central mediator)라고 하였다.[12)13)] 그들은 항원에 의해 과분비되는 기도 점액은 IL-13에 의존적이며, 감작된 쥐의 기관(trachea)에 재조합 IL-13 (recombinant IL(rIL)-13)을 점적(instillation)하면 기도점액의 생성이 증가한다고 보고하였다.

본 연구에서 13종류의 점액유전자 중에서 MUC2, MUC5AC와 MUC8을 이용한 이유는, MUC2와 MUC5AC는 기도점막 배세포에서 중요 점액소로 알려져 왔으며,[1)6)7)] MUC8은 저자들의 연구에서 비용 상피세포(polyp epithelium)의 중요 점액소(major mucin) 중의 하나로 밝혀졌기 때문이다.[20)]

본 연구에서는 먼저 IL-13의 용량에 따른 점액분비와 점액 유전자 발현의 양상을 관찰하였다. 총 점액양은 5 ng/ml의 IL-13 처치에서부터 통계학적으로 유의하게 감소하였고, MUC5AC 특이점액의 양도 5 ng/ml에서부터 유의한 감소를 보였다. 이러한 결과로 인해 이후에 시행한 모든 실험에서 5 ng/ml의 IL-13을 사용하였다. 5 ng/ml IL-13 처치의 시간경과에 따른 점액분비와 점액유전자 발현을 관찰한 실험에서는 IL-13 처치 4일 후부터 점액분비와 점액유전자 발현이 대조군과 통계학적으로 유의한 차이를 보이기 시작했는데, 이는 점액 mRNA가 발현되고 실제로 점액이 분비되기까지의 시간차(time lapse)로써, apomucin의 생성과 중심펩타이드(core peptide)의 당질화(glycosylaiton)에는 어느 정도의 시간이 필요하기 때문이거나, 혹은 IL-13의 효과 역시 autocrine 또는 paracrine 효과로 생각된다.

감소한 총점액양 중 MUC5AC가 차지하는 양을 보면, 먼저 예비 실험결과에서, IL-13을 처치하지 않은 대조군에서 총점액양 중 MUC5AC가 차지하는 비율이 약 15~20%(평균 18.1%)를 차지했다. (data not shown) 여기에 IL-13을 처치함으로써 총점액양 중 MUC5AC 점액이 차지하는 비율이 5 ng/ml의 IL-13 처치군에서는 4.9%, 25 ng/ml의 IL-13 처치군에서는 7.7%를 차지하는 것으로 볼 때 그 비율이 약 1/2~1/4로 감소하였다(Fig. 1A and B). 이로써 IL-13에 의한 점액양의 감소는 일부 MUC5AC의 감소에 의한 것임을 알 수 있다. 이것은 MUC2, MUC5AC, MUC8의 RT-PCR 결과에 의해서도 간접적으로 확인할 수 있었다. 처치한 IL-13의 농도증가에 의해 MUC5AC mRNA의 발현은 감소하고, MUC2와 MUC8 mRNA의 발현은 증가하는데도(Fig. 1C) 총점액양이 감소하는 것을 볼 때, MUC5AC가 감소하는 점액의 양적인 주요점액임을 보여주는 것이다. 하지만 MUC5AC 점액 이외에 MUC1, MUC4, MUC5B, MUC13 등의 점액감소에 의해 총 점액양이 감소했을 가능성도 배제할 수 없다. 또 IL-13 농도의 증가에 의해 MUC2, MUC8 mRNA의 발현이 증가하는데도(Fig. 1C) 총점액양이 감소하는 것으로 볼 때, MUC2와 MUC8 점액이 총점액에서 차지하는 양이 작다는 것을 유추할 수 있는데, 총점액에서 차지하는 양이 적다고 해서 그 역할이 작다고 할 수는 없다.

다음으로 본 연구에서는 면역조직화학 염색(immunohistochemical staning)과 cytospine 슬라이드에서 면역세포화학 염색(immunocytochemical staining)을 하여 MUC5AC 양성세포가 IL-13의 처치에 의해 감소하는 것을 조직학적으로, 통계학적으로 증명할 수 있었다.

IL-4가 배양된 사람 기관지상피세포(cultured human bronchial epithelial cells)에서 점액분비와 MUC5AC와 MUC5B의 유전자발현을 감소시킨다는, 이전의 보고들과 상반된 보고들이 있다.[17)18)] 이러한 보고들로 볼 때 IL-4는 세포수준(cellular level)에서는 점액유전자 발현이나 점액분비를 감소시킬 수 있다는 것을 유추할 수 있고, 같은 수용체 subunit, IL-4R를 가지며 같은 신호전달체계를 가지는 IL-13도 in vitro 세포수준에서는 점액유전자발현과 점액분비를 감소시킬 수 있다는 것을 예측할 수 있다. 또 이러한 결과는 IL-13이 항염효과를 가진다는 다른 저자들의 결과[21)22)]와 부합한다고 할 수 있다.

이번 연구에서 저자들은 요즈음 IL - 13이 알레르기성 천식과 알레르기성 비염의 중요매개물이라는 기존의 결과들과는 상반되게, IL - 13이 in vitro에서 배양된 사람 정상 코점막 상피세포에서는 직접적으로 MUC5AC의 유전자발현과 점액분비를 감소시킬 뿐만 아니라, 총점액분비의 양도 감소시킨다는 결과를 얻었다. 이것은 in vivo 실험에서 IL - 13에 의해 유발되는 점액분비는 IL - 13의 촉발효과(triggering effect), 즉 IL - 13이 직접적으로 점액분비를 증가시키는 것이 아니라 다른 세포를 자극하여 간접적으로 점액분비를 증가시키는 효과를 나타낸다고 생각할 수 있다. 이러한 결과는 기도 상피세포의 in vitro 실험에서 IL - 13이 점액유전자 발현과 점액분비를 감소시키는, 점액에 대한 억제효과를 가진다는 첫 보고이다.

결론적으로 IL - 13이 배양된 사람 정상 코점막 상피세포에서 MUC5AC 유전자발현과 점액분비를 감소시킴을 알게 되었고, 알레르기성 및 염증성 코질환에 있어 치료의 target으로써 IL - 13의 역할에 대한 심도 있는 연구가 필요하다고 생각한다.

중심단어 : Interleukin - 13 · 점액소 · MUC5AC.

본 연구는 1999년도 연세대학교 교수연구비(1999 - 19)에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

1) Hovenberg HW, Davies JR, Carlstedt I. *Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. Biochem J 1996;318:319-24.*
2) Thornton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. *Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. J Biol Chem 1997;272:9561-6.*
3) Lapensee L, Paquette Y, Bleau G. *Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). Fertil Steril 1997;68:702-8.*
4) Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. *Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. Cancer Res 1999;59:4083-9.*
5) Willams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA. *MUC13 a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. J Biol Chem 2001;276:18327-36.*
6) Voynow JA, Rose MC. *Quantitation of mucin mRNA in respiratory and intestinal epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11:742-50.*
7) Buisine MP, Devisme L, Copin MC, Durand-Reville M, Gosselin B, Aubert JP, *et al. Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:209-18.*
8) Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, *et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest 1999;103:779-88.*
9) De Vries JE. *The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory reponses. J Allergy Clin Immunol 1998;102:165-9.*
10) Punnonen J, Aversa G, Cocks B, McKenzie A, Menon S, Zurawski G, *et al. Interleukin-13 induces interleukin-4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B-cells. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:3730-4.*
11) Doherty TM, Kastelein R, Menon S, Andrade S, Coffman RL. *Modulation of murine macrophage function by IL-13. J Immunol 1993;151:7151-60.*
12) Grnig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, *et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. Science 1999;282:2261-3.*
13) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, *et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science 1999;282:2258-61.*
14) Temann UA, Prasad B, Gallup MW, Basbaum C, Ho SB, Flavell RA, *et al. A novel role for murine IL-4 in vivo: Induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:471-8.*
15) Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. *IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. J Immunol 1999;162:6233-7.*
16) Takeda K, Kamanaka M, Tanaka T, Kishimoto T, Akirra S. *Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. J Immunol 1996;157:3220-2.*
17) Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH. *Expression and regulation of MUC8 by various cytokines in normal human nasal epithelial cells. Korean J Otolaryngol 2001;44:600-5.*
18) Jayawickreme SP, Gray T, Nettesheim P, Eling T. *Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. Am J Physiol 1999;276:L596-L603.*
19) Yoon JH, Gray T, Guzman K, Koo JS, Nettesheim P. *Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine, and extracellular matrix. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:724-31.*
20) Kim HU, Kim CH, Lee YH, Lee JG, Yoon JH. *Expression of MUC5AC and MUC8 in human nasal mucosa. Korean J Otolaryngol 2001;44:490-4.*
21) Watson ML, White A-M, Campbell EM, Smith AW, Uddin SJ, Yoshimura T, *et al. Anti-inflammatory actions of interleukin-13: suppression of tumor necrosis factor-α and antigen-induced leukocyte accumulation in the Guinea pig lung. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:1007-12.*
22) Lentsch AB, Czermak BJ, Jordan JA, Ward PA. *Regulation of acute lung inflammatory injury by endogenous IL-13. J Immunol 1999;162:1071-6.*